

## VYLUČOVACÍ ČI SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHIE JE JIŽ ŠEDESÁT LET

*Tento článek je věnován profesorovi Bohumilu Kratochvílovi u příležitosti jeho kulatých narozenin, jejichž nominální hodnota je odlišná od té, které je věnována tato práce.*

**FRANTIŠEK ŠVEC**

*Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Akademiya Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika  
svecfr@faf.cuni.cz*

Došlo 4.1.24, přijato 22.1.24.

Distribuce molárních hmotností je jednou z velmi důležitých vlastností polymerů stanovovaných již od doby, kdy Staudinger prosadil koncept makromolekul. První metody používané pro stanovení této distribuce byly však zdoluhavé a náročné na obsluhu. To se změnilo v roce 1964, kdy J. C. Moore, pracovník firmy Dow Chemical Company, zveřejnil metodu jím nazvanou gelová permeační chromatografie (GPC) a dnes známou spíše jako vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography, SEC). Její princip spočíval v dělení makromolekul podle velikosti na základě jejich permeace do pevné stacionární fáze, která obsahovala síť pórů různých velikostí. Dělené molekuly difundovaly pouze do pórů, které byly větší, než byla jejich velikost. Takže menší molekuly permeovaly do většího počtu pórů než molekuly velké, a tudíž se zdržely v koloně déle. Jednotlivé polymerní molekuly pak opouštěly kolonu v pořadí od největších po nejmenší. Aby se tato technika mohla rozšířit, bylo potřeba nalézt výrobce odpovídajícího přístroje, kterým se stal podnik vlastněný J. L. Watersem. Byl to důležitý počín pro jeho firmu, z níž se díky SEC stal dnes jeden z největších světových producentů zařízení pro kapalinovou chromatografii, kam SEC také patří.

**Klíčová slova:** gelová permeační chromatografie, vylučovací chromatografie, polymery, distribuce molárních hmotností

### Obsah

1. Problém velkých molekul a Staudinger
2. „Klasické“ metody měření distribuce molárních hmotností polymerů
3. Separace ve vodné fázi
4. J. C. Moore a jeho vynález
5. Příspěvek J. L. Waterse
6. Kolony
7. Princip vylučovací chromatografie
8. Detekce
9. Vylučovací chromatografie je věčná

### 1. Problém velkých molekul a Staudinger

Po staletí objevovali chemici malé molekuly a charakterizovali je. Méně pozornosti bylo věnováno molekulám velkým, i když s nimi přicházeli do kontaktu prakticky denně, aniž by si toho byli vědomi. Dokonce i věhlasní vědci, nositelé Nobelovy ceny, jako Emil Fischer či Heinrich Otto Wieland, ještě na počátku minulého století věřili, že naměřené velké hodnoty molárních hmotností někte-

rých látek byly pouze zdánlivé, neboť se podle nich jednalo o agregáty malých molekul ve formě koloidů. Tento koncept byl navržen už v roce 1861 Thomase Grahamem<sup>1</sup>, který pozoroval pomalou difuzi látek, jako byly celuloza, škrob, dextrin, tanin, albumin a mnohé jiné. Tomu však učinil přítrž Hermann Staudinger ve své přelomové práci publikované v roce 1920, v níž napsal, že tyto látky jsou tvořeny dlouhými řetězci stejných malých molekul pospojovaných kovalentními vazbami<sup>2</sup>. Zpočátku i Staudingerovi současníci odmítali přijmout jeho tehdy vpravdě revoluční přístup s tím, že není možné, aby se malé molekuly mohly pospojovat a vytvořit vysokomolekulární látku. Třeba přiznat, že tomu tak bylo i proto, že na počátku minulého století nebyla ještě známa molekulární struktura a teorie chemických vazeb. Důkazy o platnosti koncepce se však množily zejména ve třicátých letech. Například sám Staudinger jí doložil viskozimetrickými měřeními<sup>3</sup>. Herman Mark prokázal velikost makromolekul difrakcí Roentgenova záření<sup>4</sup>. Ve stejné době se rovněž začaly objevovat experimenty směřující na využití kondenzačních reakcí k cílené výrobě plastů. Vzpomeňme třeba přípravu nylonu Wallacem Caruthersem v roce 1934. Takže tato v té době původní převratná myšlenka se ujala

a Staudinger za objevy v oblasti makromolekulární chemie obdržel v roce 1953 Nobelovu cenu. Detaily týkající se vývoje Staudingerova konceptu makromolekulární chemie jsou barvitě popsány v Mülhauptově přehledovém článku<sup>5</sup>.

## 2. „Klasické“ metody měření distribuce molárních hmotností polymerů

Jak bylo již naznačeno, přírodní polymerní materiály byly k dispozici odjakživa a jejich syntetické protějšky se rovněž začaly objevovat. Jakkoliv bylo množné věřit, že se jedná o makromolekuly, teprve měření jejich molární hmotnosti mohlo být experimentálním důkazem, že tomu skutečně tak je. Oproti malým molekulám, jež mají všechny stejnou molární hmotnost, polymerizační reakce jsou povětšinou náhodné procesy, ve kterých může dojít k ukončení růstu v kterémkoliv bodě jejich vzniku. To pak vede k distribuci jejich velikostí. Aby situace byla ještě složitější, je třeba si uvědomit, že molární hmotnosti polymerů jsou stanovovány nepřímou. Rozpustí se v rozpouštědle, změří se nějaká vlastnost roztoku, a ta se pak s pomocí termodynamiky přepočítá na molární hmotnost. Polymerní chemie má k dispozici několik přímých metod, kterými lze měřit tuto veličinu jako průměr a udávat ji jako jediné číslo. Mezi ně patří stanovení koncových skupin, či měření koligativních vlastností. Nevýhodou těchto jednoduchých metod je, že je lze použít pouze pro polymery s relativně nízkou molární hmotností. Přístrojově složitější a experimentálně náročnější jsou metody, jako je měření rozptylu světla v polymerním roztoku nebo měření sedimentace v ultracentrifúze. Jak již bylo zmíněno, Staudinger ve třicátých letech pozoroval, že viskozita i zředěného roztoku polymeru byla významně vyšší než samotného rozpouštědla<sup>3,6</sup>. Měření viskozity je dodnes oblíbenou metodou pro určování průměrné molární hmotnosti polymerů a za mé doby byla též součástí laboratorních cvičení v polymerní chemii i na VŠCHT Praha. Každá z výše uvedených metod byla obestřena matematickým aparátem a podpůrnými měřeními, které z naměřené veličiny pomocí primitivních pomůcek, jako byly zpočátku tužka, papír a logaritmické pravítko, vykouzly požadovanou velikost molární hmotnosti.

Je třeba připomenout, že měřené vlastnosti závisejí na molární hmotnosti různým způsobem, což vede k různým průměrným hodnotám i pro tentýž polymer. A aby toho nebylo málo, existují různé průměry, tedy číselný, hmotnostní, viskozitní a Z-průměr, a průměr získaný z vylučovací chromatografie. Detaily lze nalézt prakticky v každé monografii či učebnici týkající se polymerní vědy. Ovšem, znalost pouhé průměrné hodnoty v řadě případů není postačující, neboť mnohé vlastnosti polymerů závisejí i na distribuci velikostí makromolekul v daném materiálu. V počátečních dobách výroby a použití polymerů zanedbávání tohoto efektu vedlo k problémům se zpracovatelností různých výrobních šarží, ačkoliv všechny měly stejné hodnoty průměrných molárních hmotností. Proto bylo potřeba zahrnout do specifikací i distribuci velikostí molekul. Jis-

tým měřítkem byl poměr hmotnostní a číselné molární hmotnosti zvaný polydisperzita. Čím více její hodnota převyšuje 1, tím je širší distribuce. Ani ta však zcela nepostačuje.

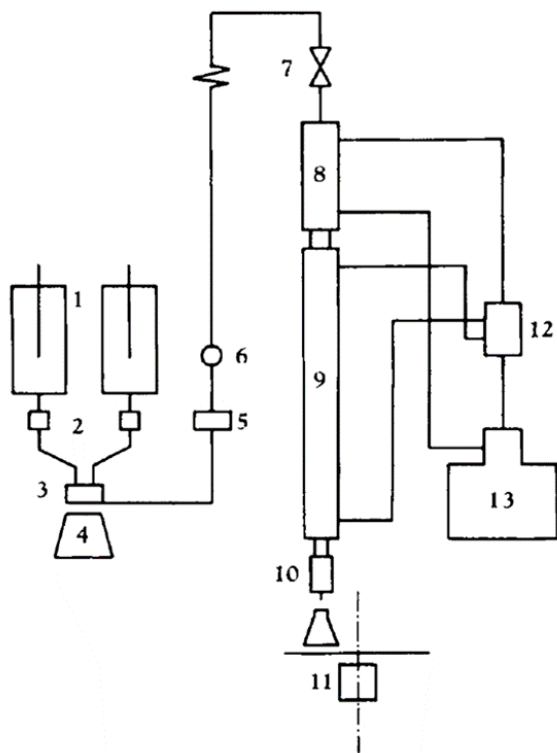
Pravděpodobně nejstarší metodou použitou k měření distribuce molárních hmotností polymerů je frakční srážení. Vychází ze skutečnosti teoreticky popsané Güntherem Schulzem<sup>7</sup>, že polymery s vyšší hmotností jsou méně rozpustné než jejich protějšky s nižší molární hmotností. V experimentálním provedení se celý experiment odehrával v dělicí nálevce o objemu mnoha litrů, do níž se umístil zředěný roztok zkoumaného polymeru. Poté se přidal menší objem srážedla, tedy kapaliny nerozpouštějící daný polymer, směs se zamíchala a nechala stát, aby se srážení na pomalu usadila na dně. Nejprve se sráželý nejdelší makromolekuly a molární hmotnost vysrážených polymerů postupně klesala, jak rostl podíl srážedla v systému. Kolem zařízení se muselo chodit doslova po špičkách, aby se systém otřesy nemíchal. Po několika dnech se usazená staženina spodem nálevky odstranila, přidala se další porce srážedla, a celý proces se mnohokrát opakoval. To mnohdy trvalo i týdny. Je tedy zřejmé, že tento postup byl příliš pomalý pro jakákoliv běžná měření a vyžadoval významné objemy rozpouštědel. Samotná separace však zdaleka nebyla koncem celého procesu, neboť každá frakce se pak musela vysušit, zvážit, a její molární hmotnost stanovit např. viskozimetricky. Tabulka z původní literatury ukázaná v obr. 1 je příkladem výsledku takové frakcionace<sup>8</sup>.

V roce 1956 popsali C. A. Baker a R. J. P. Williams přístup umožňující určité zrychlení a zjednodušení tím, že namísto srážení použili frakční rozpouštění<sup>9</sup>. Vzorek polystyrenu nanесли v tenké vrstvě na drobné neporézní skleněné kuličky tzv. balotinu, které umístili na vrchol 30 cm dlouhé kolony, na níž vytvořili gradient teploty od 60 °C na horním konci do 10 °C v nejnižším bodě. Kapalina přiváděná zpočátku na kolonu byla srážedlem pro dělený polymer, a tudíž ho nerozpouštěla. S použitím gradientu dobrého rozpouštědla se pak jednotlivé polymerní molekuly rozpouštěly počínaje těmi nejmenšími. U výtoků z kolony byl nasazen sifon, v němž se zachytávaly frakce stejného objemu a převáděly se do sběrače. Jednotlivé frakce byly pak charakterizovány stejně jako v předešlé technice. V české Poláckově modifikaci této metody byla původní jediná krátká kolona nahrazena dvěma, kdy do kratší horní o délce 30 cm se vkládaly částice s naneseným vzorkem, což usnadňovalo manipulaci. Náročný lineární teplotní gradient byl nahrazen v delší cca 1 m dlouhé koloně o vnitřním průměru 3 cm periodickými změnami nižší a vyšší teploty<sup>10</sup>. Toto monstrózní zařízení, jehož jednoduché schéma je znázorněno na obr. 2, jsme v roce 1973 použili na frakcionaci poly(vinylchlorid-co-vinylacetátu), tedy materiálu používaného na výrobu tzv. vinylových gramofonových desek<sup>11</sup>. Další zjednodušení přinesl do tohoto typu separace mnohem později Gottfried Glöckner z Drážďan, který převedl původní manuálně náročnou operaci do prostředí HPLC (cit.<sup>12</sup>). Velmi rychlých separací syntetických polymerů jsme s použitím tohoto konceptu nedávno docílili i s monolitickými kolonami<sup>13</sup>.

TABLE 3  
Fractionation of cellulose acetate butyrate

FROM 5 PER CENT SOLUTION IN PYRIDINE PRECIPITANT, ISOPROPYL ETHER			FROM 5 PER CENT SOLUTION IN GLACIAL ACETIC ACID PRECIPITANT, ISOPROPYL ETHER		
Fraction No.	Weight per cent	$[\eta]_{c=0.25}$	Fraction No.	Weight per cent	$[\eta]_{c=0.25}$
1 + 2.....	1.1	1.61	1.....	1.0	1.63
3.....	1.1	2.03	2.....	.7	1.78
4.....	3.3	2.99	3.....	.9	1.58
5.....	9.3	2.65	4.....	.8	1.48
6.....	13.6	2.28	5.....	2.8	2.06
7.....	15.7	2.03	6.....	6.7	2.67
8.....	15.6	1.79	7.....	17.5	2.21
9.....	12.1	1.50	8.....	15.8	1.93
10.....	8.1	1.24	9.....	16.2	1.71
11.....	5.4	1.11	10.....	13.7	1.34
12.....	5.1	0.94	11.....	7.0	1.17
13.....	4.4	0.74	12.....	6.4	0.95
14.....	5.2	0.52	13.....	9.9	0.69

Obr. 1. Fotokopie původní tabulky z cit.<sup>8</sup> popisující výsledek frakčního srážení roztoků acetátu-butyrátu celulosy v pyridinu nebo v ledové octové kyselině s použitím diisopropyletheru jako srážedla



Obr. 2. Schéma frakcionační aparatury podle Poláčka (cit.<sup>11</sup>). (1) zásobníky rozpouštědla a srážedla, (2) elektromagnetické ventily, (3) směšovací nádoba, (4) magnetické míchadlo, (5) odplyňovač, (6) zpětný ventil, (7) solenoidový ventil regulace průtoku, (8) horní část kolony, (9) spodní část kolony, (10) sifon, (11) sběrač frakcí, (12) relé ventilu, (13) termostat

### 3. Separace ve vodné fázi

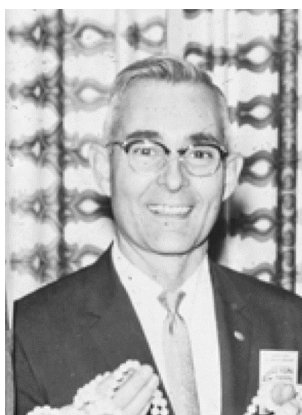
Výše uvedený text demonstroval, že metody, používané do poloviny minulého století ke stanovení distribuce molárních hmotností polymerů, byly pomalé a využívaly zejména rozdílů v jejich rozpustnosti. Jenže molekuly běžných polymerů se neliší pouze rozpustností, ale i délkou řetězců, a tedy velikostí. Nebylo by tedy záhodno využít samotných rozdílů ve velikosti pro stanovení distribuce? Bylo proto nutné obrátit pozornost k vývoji postupů, v nichž by při dělení nedocházelo k entalpiickým interakcím, nýbrž hnací silou dělení by byly rozdíly v entropii.

A to se začalo dít v padesátých letech. Tak například Hans Deuel a Hans Neukom už ve své publikaci z roku 1954 velmi krátce sdělili, že pozorovali separaci polysacharidů a solí s použitím částic zesíteného galaktomannanu<sup>14</sup>. Spolupráce Jerkera Poratha z Univerzity v Uppsale a Pera Flodina z firmy Pharmacia vedla k jejich objevu gelové filtrace, nejprve použité k odsolování větších přírodních molekul s použitím zesítených dextranových gelů<sup>15,16</sup>. Záhy poté, Jihoafričan Alfred Polson popsal separaci bílkovin podle velikosti v kolonách naplněných zesítenou agarosou<sup>17</sup>. Tyto dva produkty pak učinily firmu Pharmacia, do té doby produkující dextransy jako náhražky krevní plazmy, náhle věhlasnou v oblasti separací vodorozpustných makromolekul. A konečně Stellan Hjertén a Rolf Mosbach, rovněž z Uppsaly, připravili drobné částice drcením kopolymeru akrylamidu a *N,N'*-metylenbisakrylamidu, které též použili jako náplně chromatografických kolon k rozdělení bílkovin<sup>18</sup>. Ke všem těmto dělením docházelo díky pórům zbotnalé matrice, které sloužily podobně jako sada sít.

Jakkoliv dodnes široce používaná, všechna tato separační media fungovala ve vodou nabobtnalém stavu, a tedy

dělila pouze makromolekuly rozpuštěné ve vodě. Jak je však známo, celá spousta důležitých syntetických polymerů se ve vodě nerozpouští. Takže jejich separace s použitím těchto hydrofilních gelů nebyla možná a na metodu umožňující rychlé stanovení jejich distribuce molárních hmotností se stále čekalo.

#### 4. John C. Moore a jeho vynález



Obr. 3. John C. Moore, otec vylučovací chromatografie

Potřebná metoda se na veřejnosti objevila v roce 1964, kdy pracovník firmy Dow Chemical Company Co. z Midlandu ve státě Michigan John C. Moore, jehož fotografie je na obr. 3, publikoval svůj výzkum týkající se separace velkých molekul v roztoku<sup>19</sup>. Svoji metodu nazval gelovou permeační chromatografií (gel permeation chromatography, GPC). Titulní stránka této publikace je na obr. 4. Jak se lze snadno domnívat, Moore nejprve GPC sám otestoval a jak je běžné v průmyslovém prostředí, podal už v předcházejícím roce patentovou přihlášku, v níž popsal některé detaily. Protože však patent, jehož první strana je rovněž na obr. 4, byl udělen až v polovině roku 1967 (cit.<sup>20</sup>), široká veřejnost čerpala znalosti o GPC z publikace<sup>19</sup>, jejíž šedesátiny jsou oslavovány v tomto článku. Zde byly detailněji zkoumány dva aspekty: a) vliv poměru styrenu, divinylbenzenu a různých porogenu v polymerizační směsi na vylučovací meze připravených porézních částic a b) měření retence polystyrenových standardů s úzkou distribucí molární hmotnosti připravených aniontovou polymerizací v kolonách plněných těmito částicemi. Z retenčních časů a průtokové rychlosti pak vytvářel kalibrační křivky popisující závislost retenčního objemu na molární hmotnosti. Jeden příklad separace dvou smíchaných standardů ukázaný na obr. 5 demonstroval schopnost kolon dělit polystyreny podle jejich velikosti. Moore ve své publikaci<sup>19</sup> popsal pouze separace polystyrenu, zatímco v patentu<sup>20</sup> popsal separace i dalších polymerů včetně poly(vinylchloridu), polyethylenu, poly(ethylenglykolu), či poly(propylen-glykolu).

#### 5. Příspěvek J. L. Waterse

Nicméně věc, jak by se mohlo zdát, až zase tak jednoduchá nebyla. Uvažme, že na začátku šedesátých let minulého století prakticky neexistovala součástková základna, z níž by bylo možné těžit pro konstrukci zařízení pro GPC. V té době James L. Waters a jeho pět spolupracovníků již

několik let vyráběli různá zařízení v nepoužívané sklepní ženské vazební cele policejní stanice ve Framinghamu ve státě Massachusetts. Mezi jejich produkty byl i diferenciální refraktometr s celou o objemu 1 ml užívaný pro kontrolu průmyslových procesů. Jednoho dne v roce 1961 mu Moore zavolal a zeptal se, jestli by firma Waters Associates pro něj mohla vyrobit refraktometr s celou o objemu 0,1 ml pro měření vodných roztoků při pokojové teplotě. Ačkoliv mu neřekl, k čemu ho potřebuje, Jim Waters po jistém váhání vyhověl. O devět měsíců později přišel další požadavek na výrobu refraktometru, který by mohl pracovat s 1,2-dichlorbenzenem při teplotě 135 °C. Ani tentokrát jeho účel nebyl objasněn. To se stalo až na počátku roku 1963 poté, co byla podána patentová přihláška. Tehdy manažer prodeje firmy Waters Larry Maley navštívil Dow a dozvěděl se, že Moore nejprve dělil poly(ethylenglykoly) rozpuštěné ve vodě a později i jiné polymery rozpustné za tepla v organickém rozpouštědle. Jim Waters ve své předvídatosti shledal metodu dělení polymerů opravdu zajímavou a zakoupil exkluzivní licenci na Moorův patent. Zaplatil za ni na místě celých 10 000 dola-

JOURNAL OF POLYMER SCIENCE: PART A VOL. 2, PP. 835-843 (1964)

#### Gel Permeation Chromatography. I. A New Method for Molecular Weight Distribution of High Polymers

J. C. MOORE, *Texas Basic Research Department, The Dow Chemical Company, Freeport, Texas*

##### Synopsis

Polystyrene gels crosslinked in the presence of diluents have been made in fine-mesh bead form suitable for packing into chromatographic columns. A series of narrow molecular weight range polymer fractions was eluted through such columns with aromatic and chlorinated solvents. Effluent concentrations were detected and recorded by a continuous differential refractometer. The fractions were shown to be efficiently separated. Columns capable of separating adjacent polymeric samples of high molecular weight were prepared from gels crosslinked in the presence of large amounts of diluents having little or no solvent action on polystyrene. Smaller proportions of diluents and those with more solvent action yielded columns with lower molecular weight permeability limits. Such studies provided a unique quantitative view of the topology of the gels. They also demonstrated that rapid repetitive molecular weight distribution data can be obtained in this way on polymers for which solvents compatible with the gels are available.

#### United States Patent Office

3,326,875  
Patented June 20, 1967

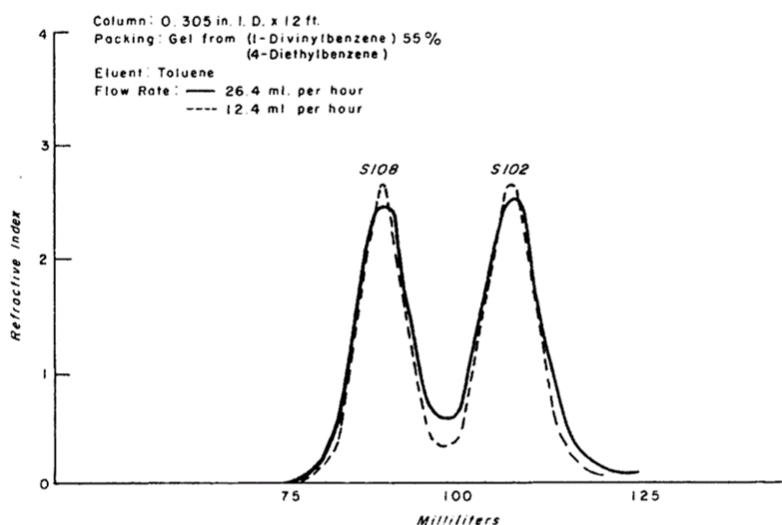
1  
2  
3,326,875  
SEPARATION OF LARGE POLYMER MOLECULES  
IN SOLUTION  
John C. Moore, Lake Jackson, Tex., assignor to The Dow  
Chemical Company, Midland, Mich., a corporation of  
Delaware  
No Drawing, Filed Jan. 31, 1963, Ser. No. 255,189  
17 Claims. (Cl. 260-92.8)

This invention relates to the separation of large molecules in solution and more particularly relates to the separation of high molecular weight materials by means of polymer gels.

A wide variety of means have been employed to fractionate solutions of polymeric materials, particularly where it is desired to determine the molecular weight distribution of the polymer in solution. Methods such as ultracentrifugation and fractional precipitation of a polymeric material from solution have all been utilized to determine or approximate the molecular weight distribution of a soluble polymeric material. Many of these techniques are time-consuming, require expensive and intricate equipment and often times the results obtained from

least about 10 mole percent of difunctional cross linking agent, if the vinyl type polymers are being employed. Utilization of sufficient quantity of the cross linking agent or difunctional monomer results in a polymer that is mechanically relatively strong, does not crush in use and the pores or openings within the polymer have little or no tendency to collapse. The rigid porous polymers may exhibit some tendency to swell slightly in certain solvents, but this is not harmful so long as the gel structure remains rigid enough not to deform under the pressures used to pack and operate the column and so that a useful flow of eluting solvent can be maintained. It is generally desirable to use a finely divided porous resin in order to assure adequate and intimate contact of the resin solution with the porous resin. Such polymers should be ground to a relatively small size for maximum effect. Generally if the rigid porous polymer is in the form of particles sufficiently small to pass a 140 mesh (U.S. Sieve size) screen, satisfactory separation will take place. Most advantageously for many applications the ground polymers should pass through a 325 mesh (U.S. Sieve size) screen. The particle size of the porous resin and method of packing will generally determine the head necessary to force

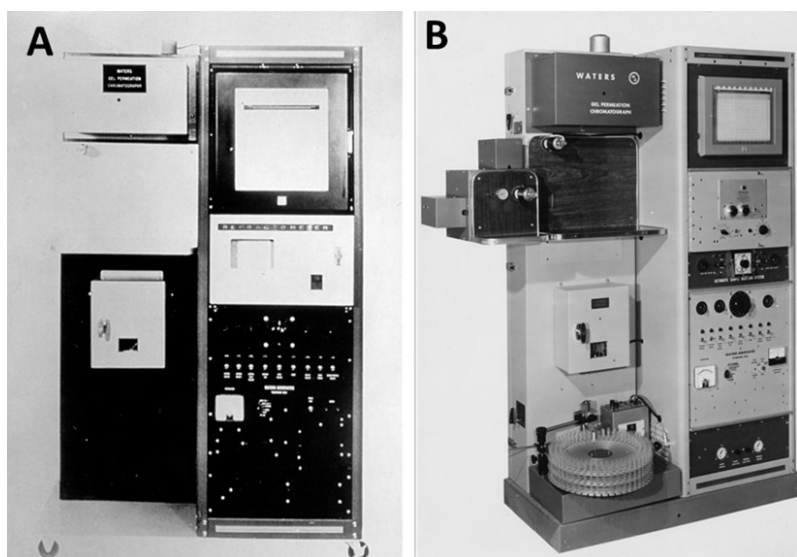
Obr. 4. Titulní strany Moorovy publikace a patentu



Obr. 5. Separace dvou polystyrenových standardů metodou SEC (cit.<sup>19</sup>). Polystyreny s molární hmotnosti 267 000 (pík označený S108) a 82 000 (pík označený S102), kolona 122 cm dlouhá o vnitřním průměru 7,7 mm, stacionární fáze 45–100  $\mu\text{m}$  částice připravené suspenzní polymerizací směsi obsahující 1 díl 55% divinylbenzenu a 4 díly diethylbenzenu, mobilní fáze toluen, průtoková rychlost 26,4  $\text{ml h}^{-1}$  (plná čára) a 12,4  $\text{ml h}^{-1}$  (přerušovaná čára)

rů a souhlasil s 10% poplatkem ze všech prodejů. První GPC prototyp od firmy Waters Associates nazvaný GPC-100 zhlédl světlo světa už v roce 1963 a pět jich bylo záhy prodáno. Obr. 6A ukazuje tento systém „oděný“ ještě do skříně z překližky. Na výstavě Pittcon se v roce 1964 již prodával model další generace GPC-200 (obr. 6B)

v plechové skříně za tehdy monumentálních 12 500 dolarů. S bližšími podobnostmi celého vývoje GPC přístrojů se lze seznámit v přehledném článku Leslieho Ettra<sup>21</sup>. Je zřejmé, že počátky dnes již chromatografického giganta Waters Corporation lze hledat právě v úspěšném zavedení GPC.



Obr. 6. Prototyp gelového permeačního chromatografu Model GPC-100 vyrobený v roce 1963 (A) a komerční produkt model GPC-200 z roku 1964 (B). Vlevo nahoře je modul optiky refraktometru, zatímco malá kovová krabička vlevo dole obsahuje zařízení kontinuálně měřící objemový průtok čerpadla. Kolonový ohřívač v zadní části levého modulu umožňuje instalaci až čtyř 122 cm dlouhých kolon o vnitřním průměru 7,7 mm. Veškerá elektronika je v pravém modulu s potenciometrickým zapisovačem nahoře. (Fotografie byly získány díky Martinovi Gilarovi, Waters Corporation)

## 6. Kolony

Podstatnou součástí Moorova vynálezu byla i příprava náplně dělicích kolon, tedy porézních zesíťovaných poly(styren-*co*-divinylbenzenových) částic, které nazýval gely. Aby svým patentem pokryl větší oblast, Moore popsal dvojitou přípravu gelů, a to v bloku a v suspenzi. První proces spočíval v polymerizaci směsi 45 % ethylstyrenu a 55 % divinylbenzenu, což byl ve skutečnosti běžný komerční 55% divinylbenzen, v přítomnosti diethylbenzenu jako tzv. porogenu. Po čtyřech dnech polymerizace při 75 a 120 °C byl blok, vlastně monolit, vyjmut z reaktoru, desintegrovan, a nepravidelné částice zachycené na sítích mezi velikostmi 45 a 75  $\mu\text{m}$  byly použity k naplnění kolon. Ve skutečnosti však jádrem patentu byla příprava sférických částic o velikosti mezi 45 a 100  $\mu\text{m}$  suspenzní polymerizací. Moore použil celou řadu monomerních směsí obsahujících styren a divinylbenzen spolu s různými rozpouštědly, porogeny, jimiž řídil vylučovací limity kolon. Detaily polymerizačního systému, jako byla velikost zařízení, polymerizační teplota a doba, či složení vodní fáze, patent neobsahuje, ale odvolává se na jiný patent jeho zaměstnavatele Dow Chemical<sup>22</sup>. Jediné, čeho se nelze dopátrat, je, proč Moore nazýval své polymery gely, ačkoliv jeho částice prakticky nemohly botnat v žádném rozpouštědle, neboť byly silně zesíťované. Z toho pak vyplynul původní název jeho metody, tedy gelová permeační chromatografie, který přetrvává. Někteří staromilci mu dodnes dávají přednost před správnějším českým názvem vylučovací chromatografie. Oficiální názvosloví IUPAC (cit.<sup>23</sup>) rovněž termín gelová permeační chromatografie nepřipouští a stanovuje jako jediný název size-exclusion chromatography neboli SEC.

Spojme, co víme o výrobcích firmy Dow Chemical Company a o Moorových objednávkách u firmy Waters Associates s příklady v jeho patentu. Počáteční motivací pro vývoj GPC byla potřeba Dow Chemical průběžně kontrolovat distribuci molární hmotnosti jejich masově produkovaných polymerů. Tak asi znělo zadání k vývoji metody toto umožňující. Moore se mohl zpočátku nechat inspirovat výsledky gelové filtrace publikovanými Porathem a Flodinem, které se ovšem pro požadované separace syntetických polymerů příliš nehodily. Z požadavku na výrobu detektoru pro vodné roztoky při normální teplotě 20 °C jasně vyplývá, že Moore nejprve připravil porézní zesíťovaný polymer v bloku, který rozdrtil, své kolony naplnil nepravidelnými pevnými částicemi a použil je pro separaci poly(ethylenglykolů). Účinnost těchto kolon byla jistě nevalná a musely být dlouhé několik metrů, aby mohl dosáhnout rozumnou separaci. Během následujících devíti měsíců a s použitím suspenzního procesu propracovaného kolegy ve firmě<sup>22</sup> Moore připravil porézní sférické částice. Ty slibovaly snazší plnění kolon, které pak mohly být i kratší. Rovněž upravil své zařízení tak, aby umožňovalo měření při vyšších teplotách a v něm separoval polyethyleny, které se v použitém 1,2-dichlorbenzenu rozpouštějí až při teplotě 100 °C.



Obr. 7. Skenovací elektronová mikrofotografie 20  $\mu\text{m}$  porézní částice 10<sup>6</sup> Styragelu. (Snímek byl získán díky Martinovi Gilarovi, Waters Corporation)

Watersova licence Moorova patentu zahrnovala i výrobu „gelů“, v nichž separace probíhaly. Zatímco Moore polymeroval své suspenze v laboratorním měřítku, Watersův podnik potřeboval zavést výrobu porézních polymerních částic, které nazvali Styragel, ve větším měřítku. Vzpomeňme, že první modely přístrojů pro GPC zahrnovaly až čtyři 122 cm dlouhé kolony o vnitřním průměru 7,7 mm. Tato délka byla nutná s ohledem na z dnešního pohledu značnou velikost používaných částic jejich náplně. Účinnost takových kolon byla nízká a musely být proto dlouhé, aby se docílilo potřebného rozlišení. Do nich se vešlo 375 ml stacionární fáze. Výroba tedy byla přenesena do 200 l velkých sudů, a ta pak pokryla potřebu prodeje. Obr. 7. představuje skenovací elektronovou mikrofotografii jedné porézní částice o průměru 20  $\mu\text{m}$  sloužící jako separační fáze s magickým názvem „10<sup>6</sup> Styragel“ patrně znamenajícím, že mohou dělit polymerní molekuly s molární hmotností až 10<sup>6</sup>.

## 7. Princip vylučovací chromatografie

Jak tedy dochází k pozorovanému SEC dělení? Princip je vcelku jednoduchý. Roztok molekul velikostně polydisperzního vzorku je čerpán kolonou obsahující porézní stacionární fázi. Tato fáze je dnes k dispozici výlučně ve formě sférických částic a sestává z pevné matrice obsahující síť pórů různé velikosti. Molekuly tak mohou difundovat pouze do pórů, které jsou větší, než je velikost jich samých. Z toho plyne, že menší molekuly mohou „navštívit“ větší počet/objem pórů než molekuly velké. To ovšem vede k tomu, že menší molekuly se v koloně zdrží déle a naopak. Makroskopicky se to pak projeví tím, že velké molekuly jsou z kolony eluovány nejdříve, neboť pronikaly pouze do omezené frakce všech pórů, zatímco nejmenší molekuly vychází z kolony až nakonec. Moleku-

ly, jejichž velikost přesahuje velikost i těch největších pórů, pak do částic nevstupují vůbec a volně procházejí kolonou volnými prostory mezi částicemi a opouští kolonu jako první. Polymerizační metody produkující porézní částice umožňují řízení distribuce velikosti pórů, a tak definují jejich separační schopnost.

Výsledkem SEC separace je pak chromatogram reprezentující signál produkovaný použitým detektorem. Tento chromatogram znázorňuje tvar distribuce, leč sám o sobě neříká nic o velikostech molárních hmotností. Proto musí být kolona kalibrována s použitím polymerních molekul s velice úzkou distribucí a tento údaj bývá jako „příbalový leták“ součástí každého balení kolony. Nyní se kombinací chromatogramu a kalibrační křivky konečně dají vypočítat absolutní hodnoty molárních hmotností, což v dnešní době hbitě vykoná příslušný software připojeného počítače.

## 8. Detekce

Jak bylo řečeno, prvním detektorem v GPC přístroji byl jednoduchý refraktometr s objemem cely 0,1 ml, který měřil rozdíl v indexu lomu čistého rozpouštědla a eluentu opouštějícího separační kolonu. Jeho citlivost však byla nevalná. V průběhu let pozvolna došlo ke splynutí přístrojové techniky pro SEC a HPLC, kolony se zkrátily z původních téměř 5 m na desítky cm a rovněž nástříky roztoku polymeru se zmenšily. To logicky vyžadovalo použití citlivějších detektorů. Např. běžný UV detektor se hodí pro detekci polymerů obsahujících UV chromofor, jako je běžný polystyren. Jiné polymery, např. polyethylen nebo polypropylen UV chromofory nemají a je třeba použít jiné detektory. Ty špičkové nejenom, že „vidí“ všechny polymery, ale umožňují přímou cestu k absolutní molární hmotnosti či k velikosti polymerních klubek. Sem patří dnes pokročilé detektory využívající rozptyl světla pod mnoha úhly (multi-angle light scattering, MALS), rozptyl světla pod malým úhlem (low-angle light scattering, LALS), viskozimetrický detektor, hmotnostní spektrometry případně ještě v kombinaci např. s indukčně vázaným plazmatem (inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS), a další.

## 9. Vylučovací chromatografie je věčná

Je zřejmé, že pokrok se nezastavil ani v oblasti měření distribuce molárních hmotností polymerů. Není divu, vezmeme-li v úvahu obrovská množství polymerů, která se globálně vyrábějí a bez jejichž přítomnosti všude kolem

nás, kterou si většinou ani neuvědomujeme, bychom dnes asi nemohli vůbec existovat. Nicméně, všechna zlepšení, která přinesl čas, nic nemění na skutečnosti, že základní princip vylučovací chromatografie vynalezené Moorem a publikované právě před šedesáti lety zůstává zachován.

## LITERATURA

1. Graham T.: *Philosoph. Trans. Royal Soc. London* 151, 183 (1861).
2. Staudinger H.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 53, 1073 (1920).
3. Staudinger H.: *Kolloid-Z.* 51, 71 (1930).
4. Mark H., Wierl R.: *Naturwissenschaften* 18, 778 (1930).
5. Mülhaupt R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 43, 1054 (2004).
6. Staudinger H.: *Trans. Faraday Soc.* 29, 18 (1933).
7. Schulz G. V.: *Z. Phys. Chem.* 179A, 321 (1937).
8. Morey D. R., Tamblyn J. W.: *J. Phys. Coll. Chem.* 51, 721 (1947).
9. Baker C. A., Williams R. J. P.: *J. Chem Soc* 2352 (1956).
10. Poláček J., Schulz L., Kössler I.: *J. Polym. Sci., Pt. C* 16, 1327 (1967).
11. Kálal J., Maroušek V., Švec F.: *Angew. Makromol. Chem.* 38, 45 (1974).
12. Glöckner G.: *Gradient HPLC of copolymers and chromatographic cross-fractionation*. Springer-Verlag, Berlin 1991.
13. Jančo M., Sýkora D., Švec F., Fréchet J. M. J., Schweer J., Holm R.: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 38, 2767 (2000).
14. Deuel H., Neukom H.: *Some properties of Locust bean gum*. American Chemical Society, Washington, D.C. 1954.
15. Flodin P., Porath J.: US patent 3002823 (1961).
16. Porath J., Flodin P.: *Nature* 183, 1657 (1959).
17. Polson A.: *Biochim. Biophys. Acta* 50, 565 (1961).
18. Hjertén S., Mosbach R.: *Anal. Biochem.* 3, 109 (1962).
19. Moore J. C.: *J. Polym. Sci., Pt. A.* 2, 835 (1964).
20. Moore J. C.: US patent 3326875 (1967).
21. Ettore L. S.: *LCGC North America* 23, 752 (2005).
22. Alfrey T., Lloyd W. G.: US patent 3322695 (1967).
23. Ettore, L. S.: *Pure Appl. Chem.* 65, 819 (1993).

**F. Švec** (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*): **Size Exclusion Chromatography Has Been Around for Sixty Years**

Molar mass distribution is one of the most important properties of polymers that has been determined since Staudinger introduced the concept of macromolecules. However, the first methods used to determine this distribution were tedious and difficult to use. This changed in 1964 when J. C. Moore of the Dow Chemical Company published a method he called gel permeation chromatography, now better known as size exclusion chromatography (SEC). The principle was to separate macromolecules by size based on their permeation through a solid stationary phase containing a network of pores of different sizes. The separated molecules diffused only into pores larger than their size. As a result, the smaller molecules permeated into a greater number of pores than the larger molecules and therefore remained in the column longer. The individual polymer molecules then left the column in order from largest to smallest. To scale up this technique, it was necessary to find a manufacturer of a suitable instrument, which was a company owned by J. L. Waters. This was a major achievement for his company, which, thanks to SEC, is now one of the world's largest manufacturers of equipment for liquid chromatography, of which SEC is a part.

**Keywords:** gel permeation chromatography, size exclusion chromatography, polymers, molar mass distribution



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoliv média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.